

氏 名	平田 麗
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博甲第5242号
学位授与の日付	平成27年 9月30日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	ヒト黄体化顆粒層細胞における細胞生存性に及ぼすヒト絨毛性ゴナドトロピンの影響に関する研究
論文審査委員	教授 奥田 潔 教授 齋藤 昇 准教授 木村 康二

学位論文内容の要旨

ヒトを含む多くの哺乳動物において、排卵後に形成される黄体は妊娠の成立と維持に必須のプロゲステロン (P4) を分泌する一過性の内分泌器官である。妊娠が成立した場合、着床胚から大量に分泌されるヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin; hCG) により黄体機能が維持される。ヒトにおいて hCG は黄体の P4 分泌を刺激すること、P4 は黄体細胞のアポトーシスを抑制することから、hCG は P4 を介して黄体の生存を維持すると考えられる。本研究は黄体機能調節メカニズムの一端を解明する目的で、ヒト黄体化顆粒層細胞 (hLGCs) の生存性に及ぼす hCG の影響を検討した。

研究への同意が得られた正常な排卵周期を有する 40 歳未満の体外受精患者の卵胞液より細胞を単離した。以降の研究はステロイド分泌能が維持される播種後 3 日目の hLGCs を用いて行った。1) hLGCs に hCG (0.1, 1, 10, 100 IU/ml) を添加し 24 時間培養後の細胞生存率ならびに培養上清中 P4 濃度を測定した。hCG は P4 分泌を刺激し、hCG 100 IU/ml 添加時に hLGCs の生存率を増加させたことから、hCG が hLGCs の生存性を高めることが示された。2) hLGCs に P4 (1, 10, 25, 50 μ M) および P4 receptor antagonist の onapristone (OP; 10, 25, 50, 100 μ M) を各々添加し 24 時間培養後の細胞生存率を測定した。P4 は細胞の生存性に影響を及ぼさなかったが、OP (100 μ M) により hLGCs の生存率が低下したことから ($P<0.05$)、hLGCs は自身が分泌する P4 を取り込むことで細胞の生存性を維持する可能性が示された。3) hLGCs に hCG (1, 10, 100 IU/ml) および OP (25, 50, 100 μ M) を共添加し 24 時間培養後の細胞生存率を測定した。hCG はいずれの濃度においても 100 μ M OP と組み合わせることで hLGCs の生存率を著しく低下させた ($P<0.05$)。従って hCG 存在下で P4 作用を打ち消すと急激な細胞死が誘導されることが示された。4) 実験 3 で誘導された細胞死のメカニズムを明らかにするため、hLGCs に hCG (100 IU/ml) および OP (100 μ M) を共添加し 24 時間培養した後、アポトーシス実行因子である caspase-3 (CASP3) 活性ならびにタンパク質発現、オートファジー活性の指標である LC3 mRNA 発現量を測定した。hCG+OP は CASP3 活性およびタンパク質発現を刺激したが ($P<0.05$)、LC3 mRNA 発現に影響を及ぼさなかったことから、hCG 作用時に P4 の結合を阻害することで誘導される細胞死はアポトーシスによるものであることが示された。以上、*in vitro* の hLGCs において hCG は P4 を介して hLGCs の生存を維持する一方、アポトーシスを誘導することで黄体機能を制御する可能性が示された。

論文審査結果の要旨

ヒトの不妊治療成績の向上には、妊娠成立および維持に重要な役割を果たす黄体の詳細な機能解明が必要である。本論文は、ヒト黄体機能調節メカニズムの一端を解明する目的で、ヒト黄体化顆粒層細胞 (hLGCs) の培養系を確立し、その生存性に及ぼすヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の影響を検討するために実施された以下の実験成果をまとめたものである。

本研究では、1) hLGCs の培養条件を検討するために、コラーゲンコートの有無による細胞接着率、培養日数によるプロジェステロン (P4) およびエストラジオール産生量の変化、採取患者年齢による hLGCs の P4 産生量の違い、2) hLGCs の生存性における hCG および P4 の役割を検討した。1) コラーゲンコートにより hLGCs の高い細胞接着率が得られ、培養 4 日目までホルモン産生能が保たれることが示された。また 40歳未満では年齢による P4 産生量に差はないことが示された。2) hCG (100 IU/ml) により hLGCs の生存性が増加した。一方、P4 による生存性への影響は認められなかったが、P4 レセプターアンタゴニストである onapristone (OP; 100 μ M) は生存率を低下させたことから、P4 が hLGCs の生存に寄与することが示された。さらに hCG+OP が生存性を著しく低下させたことから、hCG の作用に P4 が重要な役割を果たすことが示唆された。また、hCG+OP がアポトーシス実行因子である caspase-3 活性およびタンパク質発現を刺激したことから、生存性の低下はアポトーシスによることが示された。以上のことから、*in vitro* の hLGCs において hCG は P4 を介して hLGCs の生存を維持する一方、アポトーシスを誘導することで黄体機能を制御する可能性が示された。

これらの知見はヒト黄体機能調節機構の解明に向けた重要な知見であり、黄体に起因する不妊症あるいは初期流産の治療法に寄与する基礎資料として、極めて意義深いものである。本学位審査会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考資料を審査し、本論文が博士学位 (農学) に値するものと判断した。